

bei unzureichender Pufferkapazität ist bei pH 9 größer als bei pH 7,6.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann die Bestimmung der durch GSH aktivierten Serum-CPK

über die Vorwärtsreaktion im optischen Test als die am wenigsten störanfällige Methode mit einer auch für Normalseren ausreichenden Empfindlichkeit angesehen werden.

Literatur

1. AEBI, U., R. RICHTERICH, J. P. COLOMBO und E. ROSSI, *Enzymol. biol. clin.* 1, 61 (1961/62). — 2. ASKONAS, B. A., *Biochem. J.* 48, 42 (1951). — 3. BAUMANN, P., J. ESCHER und R. RICHTERICH, *Schweiz. Zschr. Sportmed.* 10, 33 (1962). — 4. BERNT, E. und H. U. BERGMAYER, in: H.-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, S. 859. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1962). — 5. BURGER, A., R. RICHTERICH und H. AEBI, *Biochem. Z.* 339, 305 (1964). — 6. CHAPPELL, J. B. und S. V. PERRY, *Biochem. J.* 57, 421 (1954). — 7. COLOMBO, J. P., R. RICHTERICH und E. ROSSI, *Klin. Wschr.* 40, 37 (1962). — 8. CONN, R. B. und V. ANIDO, *Amer. J. Clin. Path.* 46, 177 (1966). — 9. DEUL, D. H. und J. F. L. VAN BREEMEN, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 10, 276 (1964). — 10. DREYFUS, J.-C., G. SCHAPIRA und J. DÉMOS, *Rev. franc. Et. clin. biol.* 5, 384 (1960). — 11. DREYFUS, J.-C. und G. SCHAPIRA, *Rev. franc. Et. clin. biol.* 5, 386 (1960). — 12. DREYFUS, J.-C. und G. SCHAPIRA, *Rev. franc. Et. clin. biol.* 6, 700 (1961). — 13. DUMA, R. J., und A. L. SIEGEL, *Arch. Int. Med., Chicago* 115, 443 (1963). — 14. EBASHI, S., Y. TOYOKURA, H. MOMOI und H. SUGITA, *J. Biochem. (Tokyo)* 46, 103 (1959). — 15. ENNOR, A. H. und H. ROSENBERG, *Biochem. J.* 57, 203 (1954). — 16. FISKE, C. H. und Y. SUBBAROW, *J. biol. Chemistry* 81, 629 (1929). — 17. FLEISHER, G. A., W. M. MCCONAHAY und M. PANKOW, *Mayo Clin. Proc.* 40, 300 (1965). — 18. GRAIG, F. A. und G. ROSS, *Metabolism* 12, 57 (1963). — 19. GRAIG, F. A. und J. C. SMITH, *J. clin. Endocr., Springfield* 25, 723 (1965). — 20. GRIFFITHS, P. D., *Lancet (London)* I, 894 (1963). — 21. HUGHES, B. P., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 7, 597 (1962). — 22. JACOBS, H., H. W. HELDT und M. KLINGENBERG, *Biochem.*

Biophys. Res. Comm. 16, 516 (1964). — 23. KAR, N. C. und C. M. PEARSON, *Amer. J. Clin. Path.* 43, 207 (1965). — 24. KUBY, S. A., L. NODA und H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* 209, 191 (1954). — 25. LEHMANN, F.-G., K. W. SCHNEIDER und H. MENGE, *Enzymol. biol. clin.* 6, 36 (1966). — 26. NIELSEN, L. und B. LUDVIGSEN, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 62, 159 (1963). — 27. NODA, L., T. NIHEI und M. F. MORALES, *J. biol. Chemistry* 235, 2830 (1960). — 28. OKINAKA, S., H. SUGITA, H. MOMOI, Y. TOYOKURA, H. KUMAGAI, S. EBASHI und Y. FUJIE, 84th. ann. Meet. Amer. neurol. Ass., Atlantic City (1959). — 29. OLIVER, I. T., *Biochem. J.* 61, 116 (1955). — 30. ROSAKI, S. B., *Nature (London)* 207, 414 (1965). — 31. ROTTHAUWE, H. W., S. ZURUKZOGU-SKLAVOUNOU und H. HAMMANN, *Klin. Wschr.* 39, 1269 (1961). — 32. ROTTHAUWE, H. W. und M. CERQUEIRO, *Klin. Wschr.* 41, 876 (1963). — 33. ROTTHAUWE, H. W. und M. CERQUEIRO, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 10, 134 (1964). — 34. ROTTHAUWE, H. W. und S. KOWALEWSKI, *Klin. Wschr.* 43, 150 (1965). — 35. ROTTHAUWE, H. W. und S. KOWALEWSKI, *Humangenetik* 3, 30 (1966). — 36. ROTTHAUWE, H. W. und S. KOWALEWSKI, *Klin. Wschr.* 45, 387 (1967). — 37. SAX, S. M. und J. J. MOORE, *Clin. Chem. (New York)* 11, 951 (1965). — 38. SCHAPIRA, F. und J.-C. DREYFUS, *Ann. Biol. clin.* 22, 349 (1964). — 39. SJÖVALL, K. und A. VOIGT, *Nature (London)* 202, 701 (1964). — 40. STEIN, P. und W. LAMPRECHT, *Klin. Wschr.* 40, 177 (1962). — 41. TANZER, M. L. und C. GILVARG, *J. biol. Chemistry* 234, 3201 (1959). — 42. WEBER, H. und R. RICHTERICH, *Klin. Wschr.* 41, 665 (1963). — 43. WILSON, K. M., K. A. EVANS und C. O. CARTER, *Brit. Med. J.* 1965, 750.

Priv.-Doz. Dr. Dr. H. W. Rotthauwe
53 Bonn, Adenaurallee 119

Dünnschichtchromatographische Methode zur Isolierung und Bestimmung der Porphyrine im Urin

Von M. DOSS und W. MANNHEIM

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg/Lahn (Direktor: Prof. Dr. R. Siegert)

(Eingegangen am 17. Januar 1967)

Es wird eine quantitative Methode für die Analyse von Copro- und Uroporphyrin im Urin beschrieben. Sie besteht darin, daß nach Lyophilisierung des Urins Porphyrinmethylester hergestellt, dünn-schichtchromatographisch isoliert und in Chloroform spektrophotometrisch gemessen werden.

A quantitative method is reported for the analysis of copro- and uroporphyrin in urine. After lyophilisation of the urine, porphyrin methyl esters are prepared, isolated by thin layer chromatography and measured in chloroform solution.

Porphyryne werden im allgemeinen als freie Säuren in wäßriger Salzsäure oder als Methylester in organischen Lösungsmitteln photometrisch bestimmt (1—5). Die Isolierung der freien Säuren erfolgt mit Adsorptions- und Extraktionsmethoden sowie mit säulenchromatographischen und papierelektrophoretischen Trennungsgängen (Zusammenstellung bei (1)). Die Porphyrin-extrakte enthalten meist noch Verunreinigungen, so daß

ihre quantitative Bestimmung durch Messung der Absorption in verschiedenen Wellenlängen und mit Hilfe von Korrekturfaktoren durchgeführt wird (6—8).

Bei der Untersuchung des Porphyringehalts von Bakterienkulturfiltraten zeigte sich, daß kleinste Mengen von Protoporphyrin ($< 1 \text{ nMol/ml}$) nach direkter Veresterung der Porphyrine im biologischen Material zu Methylestern und anschließender dünn-schichtchromato-

graphischer Auftrennung und Isolierung rein dargestellt werden können (9). Eine qualitative chromatographische Trennung von Porphyrinmethylestern auf Kieselgel wurde bereits von DEMOLE (10) angegeben. Die präparativen und analytischen Möglichkeiten eines dünn-schichtchromatographischen Verfahrens sind jedoch nicht näher untersucht und genutzt worden. Ihre Prüfung wurde durch die Tatsache angeregt, daß die im UV-Licht bei 355 nm rotfluoreszierenden Porphyrinmethylester bei der Extraktion aus der Methanol/ H_2SO_4 /Wasser-Phase schnell und vollständig in Chloroform überführt werden können. Da sich die Methylester der einzelnen Porphyrine im Gegensatz zu den freien Säuren in ihrer Löslichkeit wenig unterscheiden, bietet sich die Chromatographie als geeignetste Trennungsmethode an. Bei der routinemäßigen Untersuchung bakterieller Porphyrine ergab sich, daß die Dünnschichtchromatographie neben einer schnellen qualitativen Beurteilung vor allem auch eine quantitative Isolierung der Porphyrine als Methylester ermöglicht (11, 12). Die Vorteile des Verfahrens liegen in der Gewinnung von Reinsubstanzen und demzufolge in einer vereinfachten spektrophotometrischen Analyse. Unsere Versuche, Porphyrine als Vergleichssubstanzen aus porphyrischen Urinen zu isolieren, ergaben, daß sich diese Methode zur quantitativen Bestimmung von Copro- und Uroporphyrin im Urin eignet.

Methodik

Reagenzien

Methanol/ H_2SO_4 5 Vol-proz. (5 ml/konz. H_2SO_4 in 95 ml/Methanol p. a. unter Kühlung); Natriumbicarbonat; Natriumsulfat; Petroläther (Kp. 30–60°); Benzol; Äthylacetat; Methanol; n-Butanol; Chloroform.

Apparate

Hochvakuumpumpe.
Rotationsverdampfer („Rotavapor“ Fa. Büchi, Schweiz).
Dünnschichtchromatographie (Streichgerät der Fa. Desaga, Heidelberg): Glasplatten 20×20 cm, beschichtet mit Kieselgel H nach STAHL (Fa. E. Merck, Darmstadt), Schichtdicke 0,5 mm; Aktivierung der Platten nach 2 Stdn. Lufttrocknung bei 105° über 60 Min. im Wärmeschrank.
UV-Lampe (355 nm; Quarzlampen-Gesellschaft m. b. H., Hanau).
Schichtabsaug- und Elutionsgerät (Fritte G3) nach GOLDRICK und HIRSCH (13) der Fa. Glastechnische Werkstätten E. Zimmermann, Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52.
Photometer: Zeiss Spektralphotometer PMQ II.

Ausführung

Lyophilisierung, Veresterung und Extraktion

10 (20) ml Urin werden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt und in der Speedivac-Gefrier-trocknungsanlage (Modell 5 PS, Fa. Edwards High Vakuum) lyophilisiert. Alle Arbeiten erfolgen weitgehend im Dunkeln; die Gefäße werden mit schwarzem Papier umhüllt. Die gefriergetrockneten Proben werden mit 10 (20) ml Methanol- H_2SO_4 versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur gehalten. Während dieser Zeit erfolgt die Veresterung der freien Porphyrine zu Porphyrinmethylestern. Nach Zugabe von 50 (100) ml aqua dest. werden die Porphyrinmethylester viermal mit 5–10 ml Chloroform kräftig ausgeschüttelt. Der Chloroform-extrakt wird einmal mit halbgesättigter wäßr. $NaHCO_3$ und zweimal mit aqua dest. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, in einen 25 (50) ml Spitzkolben filtriert und am Rotationsverdampfer eingedampft.

Dünnschichtchromatographie

Die in möglichst wenig Chloroform (<0,5 ml) wieder gelösten Porphyrinmethylester werden auf eine Kieselgel-H-Platte in Form eines dünnen Streifens, der sich über die ganze Breite der Platte erstreckt, mit einer Saughütchen-Pipette (ausgezogenes Glasrohr) aufgetragen. Sorgfältiges, mehrmaliges Nachspülen mit Chloroform und wiederholtes Auftragen auf die Startzone sind für eine quantitative Überführung unerlässlich. Eine dabei auftretende Verbreiterung des Startstreifens wird nach kurzer Laufstrecke im ersten Lösungsmittelsystem ausgeglichen. Es laufen jeweils Testsubstanzen (Protoporphyrin-IX-dimethylester, Coproporphyrin-I-tetra-methylester, Uroporphyrin-I-okta-methylester, Fa. Koch-Light-Laboratories, Colnbrook, England) mit. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt aufsteigend in den Lösungsmittelsystemen:

- A) Chloroform/Methanol 9 : 1 (V/V); Laufstrecke 2 cm (2 Min.),
- B) Petroläther/Äthyläther 1 : 1 (V/V); Laufstrecke 12 cm (20 Min.),
- C) Benzol/Äthylacetat/Methanol/Butanol 82 : 14 : 3 : 1 (V/V); Laufstrecke 10 cm (20 Min.).

Man trocknet zwischen den einzelnen Entwicklungsstufen die Platte mit einem Föhn. Mit dem System B werden nicht die Porphyrine, sondern andere, im Chloroformextrakt enthaltene Harnfarbstoffe soweit aufgetrennt, daß sie im Lösungsmittelsystem C mit den R_F -Werten der Porphyrinmethylester nicht interferieren. Nach Entwicklung der Platte im Lösungsmittelsystem C werden die im UV-Licht rotfluoreszierenden Streifen auf der noch feuchten Platte mit dem Skalpell markiert, ehe die Schicht dieser Substanzstreifen nach Lufttrocknung der Platte mit dem Spatel abgelöst und in das Schichtabsaug- und Elutionsgerät, das an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, aufgenommen wird. Nach Elution der Coproporphyrinmethylester mit Chloroform, der Uroporphyrinmethylester mit Chloroform/Methanol 9 : 1 (V/V) unter Stickstoff werden die Substanzen einzeln im Lösungsmittelsystem C rechromatographiert (Abb. 1). Der Substanzverlust bei einer chromatographischen Aufarbeitung im Bereich von 2–4 µg liegt für Uroporphyrin bei 3%, für Coproporphyrin bei 5%.



Abb. 1

Kieselgel-H-Dünnschichtchromatogramm der Porphyrinmethylester (PME): a) Pentacarboxy-PME; b) Uro-PME; c) Copro-PME; d) Protoporphyrin-IX-ME; e) Copro-PME; f) Uro-PME. a)-c) aus Urin isoliert, d)-f) Referenz-Substanzen. Lösungsmittelsystem: Benzol/Äthylacetat/Methanol/Butanol 82:14:3:1 (V/V). Aufnahme unter UV-Licht (355 nm).

Spektrophotometrische Bestimmung

Nach Abdampfen des Lösungsmittels löst man die Porphyrinmethylester in 2, 5 oder 10 ml Chloroform und mißt die Extinktion am Soret-Maximum (1). Mittels des millimolaren Extinktionskoeffizienten (Tab. 1) wird der Porphyringehalt berechnet:

Tab. 1
Absorptionsmaxima der Porphyrinmethylester in Chloroform

Maxima	Protoporphyrin-IX-dimethylester		Coproporphyrin-I(III)-tetramethylester			Uroporphyrin-I(III)-oktamethylester		
	a	b	a	b	c	a	b	c
Soret	407	408	400	399	399	406	405	405
IV	505	505	498	498	498	502	500	500
III	541	540	532	532	532	536	534	534
II	575	576	566	564	564	572	570	570
I	630	625	621	619	623	627	624	624
ϵ_{mM}	171		180			215		
Mol.-Gew. (freie Säuren)	562,64		654,69			830,73		

a und ϵ_{mM} : nach FALK (1); b: Substanzen von Koch-Light-Laboratories (I-Isomere); c: aus Urin isolierte Porphyrine (III-Isomere)
Messung von b und c: Recording Spectrophotometer CARY M 15 (Fa. „Applied Physic Corporation“, Monrovia, California).

Copro-(Uro-)porphyrinausscheidung =

$$\frac{E \cdot \text{Mol.-Gew.} \cdot V_1 \cdot V_3}{\epsilon_{mM} \cdot d \cdot V_2} \quad (\mu\text{g/Tag})$$

ϵ_{mM} = millimolarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke (cm)

V_1 = Volumen Urinausscheidung/Tag (ml)

V_2 = Volumen Urin zur Analyse (ml)

V_3 = Meßvolumen Chloroform (ml)

Die aus dem Urin isolierten Porphyrine werden anhand des R_F -Wertes im Vergleich zu Testsubstanzen durch Rotfluoreszenz im UV-Licht und mit spektrophotometrischer Analyse der Absorptionsmaxima (Abb. 2, Tab. 1) identifiziert. Damit erscheint die Spezifität der Methode gesichert.

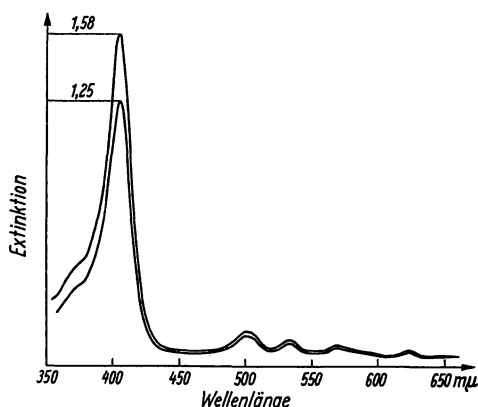


Abb. 2

Absorptionsmaxima von Uroporphyrin-I-oktamethylester ($E_{405} = 1,58$; obere Kurve) und Uroporphyrin-III-oktamethylester ($E_{405} = 1,25$; aus Urin isoliert) in Chloroform; Meßgerät: „Cary M 15“-Spektrophotometer

Tab. 2

Rückgewinnungsversuche für Uro- und Coproporphyrin-ME; Zugabe der Substanz vor Extraktion der Porphyrin-ME aus Methanol/ H_2SO_4

Porphyrin-Methylester (ME)	Menge in μg			Ausbeute %
	in 10 ml Urin	zu-gesetzt	nach Zusatz	
Coproporphyrin-tetra-ME	3,70 (3,96)	4,07	6,67 (7,02)	86,6
Uroporphyrin-okta-ME	4,38 (4,77)	5,61	9,57 (8,96; 9,36)	91,3

Rückgewinnungsversuche

Die Überprüfung der Rückgewinnung schließt Extraktion, Chromatographie und Elution ein. Die Veresterung (mit nicht nachgetrocknetem Methanol p. a.) ist unter den angegebenen Bedingungen praktisch vollständig. Dies ergab sich für Di-, Tetra- und Oktacarboxyporphyrine aus Versuchen mit bakteriellen Präparationen; mit Protoporphyrin (Fa. Sigma, Chemical Com-

pany, USA) wurde der Befund auch gravimetrisch bestätigt. Es wurden bekannte Mengen Copro- und Uroporphyrinmethylester mehreren Urinproben zugesetzt und Urinproben ohne Zusätze parallel aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Rückgewinnungsversuche für Copro- und Uroporphyrin zeigt Tabelle 2.

Präzision der Methode

16 Einzelbestimmungen in einem porphyrischen Urin, wobei je 8 Urinproben von 5 und 10 ml zur Analyse kamen, wurden statistisch ausgewertet und die Standardabweichung der Einzelbestimmung (s) sowie die prozentuale Abweichung vom Mittelwert (Variationskoeffizient, V) errechnet. Die Fehlerbreite der Analysen geht aus Tabelle 3 hervor.

Isomerenanalyse

Zur Differenzierung der einzelnen Porphyriformen werden die Porphyrine der Isomerenreihen I und III chromatographisch getrennt. Die akut intermittierende Form der hepatischen Porphyrie, die als häufigste Porphyrinrankheit in 60 bis 70% aller Fälle auftritt (14), wird vor allem durch den Nachweis von Uroporphyrin III diagnostisch gesichert. Uroporphyrin I wird bei der kongenitalen Porphyrie des Menschen und des Rindes gefunden.

Uroporphyrin-Isomere

Die Uroporphyrin-Isomeren werden als Methylester auf Papier (Whatman No. 1 oder Schleicher und Schüll 2043b) mit der Dioxan-Methode nach FALK und BENSON (15) getrennt. Da aus den vorangehenden Isolierungsgängen reine Substanzen gewonnen werden, kann auf die erste Entwicklung im System Chloroform-Kerosin verzichtet werden. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend im System Kerosin/Dioxan 4:1 (V/V) auf Papierstreifen 18×11 cm. Uroporphyrin-III-oktamethylester (Testsubstanz und Präparate aus porphyrischen Urinen) wandert 2,5 bis 3,0 cm und setzt sich meistens klar und ohne Streifenbildung ab, wenn nicht mehr als $0,5 \mu\text{g}$ aufgetragen werden. Dagegen beobachtet man bei Uroporphyrin-I-oktamethylester (Testsubstanz und Isolierung aus Aerobiern (11)) häufig eine vertikale streifige Ausziehung der am Startpunkt liegengebliebenen Substanz zur Position des Uroporphyrin-III-methylesters. Für die Auswertung unter dem UV-Licht müssen die Chromatogramme trocken sein (Trocknung 10. Min. bei 105°). Die kritischen Seiten der Isomerentrennung, wie sie FALK (1) diskutierte, haben CONFORD und BENSON (16) einer detaillierten quantitativen Studie unterzogen, die es ermöglicht, Fehlbeurteilungen zu vermeiden. Die

Tab. 3
 Porphyrinbestimmung im Urin bei einer hepatischen Porphyrie

Porphyrin-Methylester (ME)	ml Urin zur Analyse	μg Porphyrin-ME aus getrennt lyophilisierten Urinproben (pro 1000 ml Urin)				$\bar{x} \pm 2s$	V
Coproporphyrin-III-tetra-ME	5	354	324	364	340	346 \pm 35	\pm 5,0
	10	350	332	358	322	341 \pm 33	\pm 4,8
Uroporphyrin-III-okta-ME	5	876	954	930	856	904 \pm 91	\pm 5,1
	10	890	838	868	910	877 \pm 62	\pm 3,5

Uroporphyrinmethylester I und III lassen sich aber auch auf Dünnschicht-Cellulose-Platten (Cellulose-Pulver MN 300, Teilchengröße: \varnothing 10 μ ; Fa. Macherey-Nagel, Düren) 10 \times 8 cm in demselben Lösungsmittelsystem trennen. Der Trenneffekt ist gegenüber der Papiermethode unverändert.

Coproporphyrin-Isomere

Zur Trennung der Coproporphyrin-Isomeren erwies sich die aufsteigende Chromatographie der freien Säuren auf Papier nach ERIKSEN (1), die auf frühere Beobachtungen von FALK und BENSON (1) zurückgeht, als am besten reproduzierbar. Mit einer Modifikation von JENSEN (17) können die Coproporphyrin-Isomere auch dünn-schicht-chromatographisch auf Kieselgel G (wir verwendeten Kieselgel H) getrennt werden.

Hydrolyse der Coproporphyrinmethylester: Man löst Porphyrimethylester in 25proz. HCl; die Hydrolyse ist nach 48 Stdn. bei Raumtemperatur vollständig. Die Lösung wird mit NaOH und Natriumacetat auf pH 4 gebracht; nach Extraktion der freien Säuren in Äther wird der Ätherextrakt mit aqua dest. neutral gewaschen, über einer kleinen Menge Natriumsulfat (2 Spatelspitzen) getrocknet, filtriert und eingedampft. Die freien Coproporphyrine werden in folgendem Lösungsmittelgemisch (ERIKSEN) aufgetragen: konz. Ammoniak/Wasser/Aceton 1 : 2 : 7 (V/V). Die Entwicklung erfolgt auf Papierstreifen (Schleicher und Schüll 2043b) 18 \times 11 cm im Lösungsmittelsystem 2,6-Lutidin/Wasser 5 : 2 (V/V) oder auf Kieselgel-H-Platten 5 \times 20 cm im Lösungsmittelsystem 2,6-Lutidin/Wasser 10 : 3 (V/V). In beiden Verfahren wird zur atmosphärischen Sättigung ein zylindrisches Glas mit konz. NH_4OH auf den Boden des Chromatographiegefäßes gestellt. Coproporphyrin-III ist die schneller wandernde Substanz.

Ergebnisse und Diskussion

Umwandlung von Porphobilinogen zu Uroporphyrin

Porphobilinogen kann im sauren Milieu oder enzymatisch zu Uroporphyrin III konvertieren. Die größte Menge von Uroporphyrin III (und geringe Mengen von Uroporphyrin I), die im Urin von Patienten mit akuter Porphyrie gefunden wird, entsteht nicht-enzymatisch aus dem ausgeschiedenen Porphobilinogen (1). Die idealen Bedingungen für diese chemische Konversion wurden noch nicht definiert (2). SCHWARTZ und Mitarbeiter (2) erhielten die besten Ergebnisse bei Ansäuern des Urins auf 0,03N HCl und 30 Min. Erhitzen. im Wasserbad. Parallel dazu wurde der unbehandelte Urin aufgearbeitet, um den nativen Gehalt an Uroporphyrin zu bestimmen. Wir haben den Urin sofort (Einzelpotionen oder nach

dem Zeitpunkt des Sammelns) lyophilisiert oder bei -20° aufbewahrt, da wir im Urin, der sechs Tage bei $+4^\circ$ stand, eine Zunahme von Uroporphyrin feststellten. Sollen dagegen alle Intermediärprodukte (von einschließlich des Porphobilinogens bis einschließlich des Uroporphyrinogens), die zu Uroporphyrin konvertieren können, mit erfaßt werden, ist der Urin vorher zu erhitzen (2).

Kritische Aspekte der Methode

Ein Verfahren zur spektrophotometrischen Porphyrinbestimmung ohne Korrekturfaktoren muß notwendigerweise auf der Isolierung von Reinsubstanzen basieren. Die Porphyrinmethylester sind charakterisiert, wenn nach Chromatographie auf Kieselgel ein im UV-Licht rotfluoreszierender Fleck ohne begleitende, andersfarbig fluoreszierende Zonen vorhanden ist, und die Lage der einzelnen Absorptionsmaxima (Tab. 1) und der Kurvenverlauf des Spektrogramms (Abb. 2) zwischen den einzelnen Absorptionsmaxima mit den ebenfalls dünn-schicht-chromatographisch gereinigten Vergleichssubstanzen identisch sind. Die Größenordnung der Ausbeuten und Abweichungen (Tab. 2, 3) gewährt bei einer sicheren Kontrolle und Reproduzierbarkeit der chromatographischen Technik auch die Auswertung von Einzelbestimmungen (11).

Die beschriebene Methode wurde mit anderen Verfahren (2, 3, 6, 8) nicht systematisch verglichen, jedoch ergaben Stichproben, daß auch in fraglichen Fällen die Isolierung der Prophyryne gelang. Werden 10 ml Urin aufgearbeitet, liegt der untere Bereich der Porphyrinbestimmung bei 36 μg Copro- bzw. 39 μg Uroporphyringehalt pro 1000 ml Urin für eine Extinktion von 0,1 am Soret-Maximum ($V_3 = 2$ ml; $d = 2$ cm). In 50 ml gefriergetrocknetem Normalharn wurde der Coproporphyringehalt von 15 μg /Tag (1500 ml Gesamtvolumen) erfaßt ($E = 0,14$).

Auf die Isolierung und Bestimmung von Protoporphyrin wurde in der Methodik nicht eingegangen, da es bis auf zwei Mitteilungen (18, 19) keine sicheren Hinweise für das Vorkommen von Protoporphyrin im normalen und pathologischen Harn gibt (2). In Analogie zum Nachweis bakterieller Dicarboxyporphyrine (9, 12) ist anzunehmen, daß Protoporphyrin aus dem porphyrischen Urin herausfraktioniert werden kann, wenn es vorliegt. Wir haben im Urin von acht an einer Porphyrie erkrankten Patienten kein Protoporphyrin nachweisen können. Ist im Porphyringemisch das relativ instabile Protoporphyrin enthalten, so wird die Veresterung bei $+4^\circ$ über 48 Stdn. durchgeführt (9), da im Vergleich der Protoporphyrinausbeuten aus bakteriellen Zellsuspensionen

sionen, in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur, in den bei Zimmertemperatur veresterten Ansätzen um 20% weniger Protoporphyrin gefunden wurde. Protoporphyrin allein wird auch bei -20° in 36 Stdn. quantitativ in Methylester überführt. Die Ausbeute für Protoporphyrin (Extraktion, Chromatographie) beträgt bei $1\text{ }\mu\text{g}$ 60%, bei $10\text{ }\mu\text{g}$ 70% und bei 5–10 mg (einschließlich Veresterung) gravimetrisch bestimmt über 80%.

Die Verfasser sind Dr. AMY BENSON, Department of Chemical Pathology, University College Hospital Medical School, London, und Dr. R. J. PORRA, C. S. I. R. O., Division of Plant Industry, Canberra (Australia) für die Überlassung von Uroporphyrin-III Testsubstanz, Dr. JUNE LASCELLES, Department of Bacteriology, University of California, Los Angeles, für die Überlassung von Coproporphyrin-III Testsubstanz zu Dank verpflichtet. Die Messung der Absorptionsmaxima wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. H. WITZEL, Biochemische Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Marburg, durchgeführt.

Literatur

1. FALK, J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964). — 2. SCHWARTZ, S., M. H. BERG, I. BOSSENMAIER und H. DINSMORE, Methods of Biochemical Analysis, Bd. VIII, Interscience, New York (1960). — 3. SCHLENKER, F. S. und C. L. KITCHELL, Amer. J. Clin. Path. 29, 593 (1958). — 4. SCHLENKER, F. S., N. A. TAYLOR und C. L. KITCHELL, Amer. J. Clin. Path. 44, 189 (1965). — 5. FRANZINI, C. und M. L. SOLA, Minerva med. 57, 112 (1966). — 6. RIMINGTON, C. und S. L. SVEINSSON, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 2, 209 (1950). — 7. RIMINGTON, C., Biochem. J. 75, 620 (1960). — 8. WITH, T. K., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 7, 193 (1955). — 9. DOSS, M. und W. MANNHEIM, Experientia (Basel), 23, 31 (1967). — 10. DEMOLE, E., J. Chromatogr. (Amsterdam), 1, 24 (1958). — 11. MANNHEIM, W. und M. DOSS, Z. Naturforsch. 22b, 359 (1967). — 12. MANNHEIM, W. und M. DOSS, in Vorbereitung. — 13. GOLDRICK, B. und J. HIRSCH, J. Lipid Res. 4, 482 (1963). — 14. FILIPPINI, L., Dtsch. med. Wschr. 91, 959 (1966). — 15. FALK, J. E. und A. BENSON, Biochem. J. 55, 101 (1953). — 16. CONFORD, P. A. D. und A. BENSON, J. Chromatogr. (Amsterdam) 10, 141 (1963). — 17. JENSEN, J., J. Chromatogr. (Amsterdam) 10, 236 (1963). — 18. BRUGSCH, J., Zschr. exper. Med. 103, 518 (1938). — 19. WATSON, C. J., J. Clin. Invest. 15, 327 (1936).

Dr. M. Doss

355 Marburg, Pilgrimstein 2

Quantitative Erfassung und klinische Bedeutung der Betaninurie

Von M. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M. TH. AIELLO und M. V. AIELLO¹⁾

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)

(Eingegangen am 17. Februar 1967)

Es ist seit langem bekannt, daß gelegentlich nach Genuß von Roten Rüben (*Beta vulgaris*) rot gefärbter Urin ausgeschieden wird. Dies kann den Verdacht einer Hämaturie oder der Ausscheidung bestimmter Medikamente erwecken. Bei dem ausgeschiedenen roten Farbstoff handelt es sich um Betanin. Während bisher angenommen wurde, daß nicht alle Personen „Ausscheider“ sind, sondern das Phänomen abhängig sei vom pH-Wert des Urins, von genetischen Gegebenheiten, Permeabilitätsstörungen der Niere, allergischen Erscheinungen, bestimmten Anämieformen oder auch dem Farbstoffgehalt der Roten Rüben bzw. der aufgenommenen Rübenmenge, konnten wir bei allen untersuchten gesunden Personen mit einem empfindlichen säulenchromatographischen Verfahren nach Rote Rüben-Aufnahme Betanin, wenn auch z. T. in sehr geringer Menge im Harn nachweisen. Bei ein- und derselben Person zeigten sich von Tag zu Tag starke Schwankungen sowohl bezüglich der ausgeschiedenen Menge als auch der Konzentration. Tägliche Aufnahme über 47–66 Tage führte zu keiner nennenswerten Änderung etwa im Sinne einer Fermentadaptation. Damit läßt sich die Einteilung in Betanin-„Ausscheider“ und -„Nicht-ausscheider“ nicht aufrechterhalten, die Fähigkeit zur Resorption und Ausscheidung von Betanin scheint vielmehr grundsätzlich gegeben zu sein, wenn auch quantitative Unterschiede auftreten. Selbst bei stärkerer Ausscheidung von Betanin im Harn konnte im Serum Betanin nicht nachgewiesen werden.

It has been known for a long time that the urine may sometimes become red after the ingestion of beetroot (*Beta vulgaris*). This recalls the condition of hematuria or the excretion of certain drugs. The excreted red pigment is betanin. It has been hitherto assumed that not all persons are „excreters“, but that the phenomenon depends on the pH of the urine, genetic predisposition, faulty permeability in the kidneys, allergy, certain forms of anaemia, or even the pigment content of the beet or the amount of beet eaten. With the aid of a sensitive column chromatographic procedure, however, we have detected betanin, albeit sometimes in very small amounts, in the urine of all investigated healthy persons after the ingestion of beet. Each individual shows marked variations from day to day in both the amount and concentration of excreted pigment. Daily ingestion for 47–66 days caused no significant changes, and there was no indication of enzyme adaptation. Thus the classification into betanin „excreters“ and „non-excreters“ is false; the ability to absorb and excrete betanin appears to be subject to more fundamental factors, even though there are quantitative variations. Betanin could not be detected in the serum, even when the urinary betanin excretion was very high.

Betanin im Harn

Es ist seit langem bekannt, daß manche Personen nach Genuß von Roten Rüben (*Beta vulgaris*) rot gefärbten Urin ausscheiden. Dies Phänomen kann den Verdacht

einer Hämaturie oder einer Aufnahme bestimmter Medikamente erwecken. Von vornherein wurde vermutet, daß die Rotfärbung durch Betanin, den Farbstoff der Roten Rüben, verursacht wird.

Die Konstitution von Betanin ist erst 1965 durch die Arbeitsgruppe um WYLER und DREIDING (1) endgültig geklärt worden. Danach handelt es sich nicht — wie

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.